

Autores

Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho
Bióloga, D.Sc. em Genética,
pesquisadora da Embrapa
Agroindústria Tropical,
Fortaleza, CE,
cristina.carvalho@embrapa.br

Marcos Vinicius Marques Pinheiro
Engenheiro-agrônomo, M.Sc. em
Fisiologia Vegetal, doutorando em
Botânica pela Universidade Federal
de Viçosa, Viçosa, MG,
macvini@gmail.com

Fabrina Bolzan Martins
Engenheira Florestal, D.Sc. em
Ciência Florestal, professora do
Instituto de Recursos Naturais da
Universidade Federal de Itajubá,
Itajubá, MG, fabrinabm@gmail.com

Ana Claudia Ferreira da Cruz
Engenheira-agrônoma, D.Sc. em
Botânica, bolsista da Universidade
Federal de Viçosa, Viçosa, MG,
aclaudia5@hotmail.com

Wagner Campos Otoni
Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em
Genética e Melhoramento, professor
do Departamento de Biologia Vegetal,
Universidade Federal de Viçosa,
Viçosa, MG, wotoni@ufv.br

Produção de Mudas Micropropagadas de Antúrio (*Anthurium andraeanum*) cv. Eidibel por Embriogênese Somática

Introdução

A floricultura empresarial brasileira tem adquirido notável desenvolvimento e, nos últimos anos, vem se caracterizando como um dos mais promissores segmentos da horticultura intensiva no agronegócio nacional (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008). Levando-se em conta a elevada mão de obra por área, quando comparada à agricultura extensiva, a floricultura contribui para a fixação da força de trabalho no campo, além de ser importante alternativa para pequenos produtores (ANEFALOS et al., 2010).

Em 2010, as exportações brasileiras de flores e plantas ornamentais somaram US\$ 28,7 milhões, com uma redução de 7,9% sobre os valores negociados no mercado internacional no ano anterior (US\$ 31,1 milhões). Esse foi o segundo ano consecutivo de queda comercial, depois de o Brasil ter experimentado 9 anos de recordes sucessivos nos embarques dos produtos da floricultura (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011a). O desempenho decrescente do comércio externo da floricultura brasileira reflete os efeitos da crise econômica e financeira internacional nos principais mercados importadores mundiais (zona do Euro, Estados Unidos da América e Japão), além da sustentada valorização da política cambial do real, que induz à perda de competitividade das flores e plantas ornamentais brasileiras no mercado mundial (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011a).

O Brasil apresenta potencial para tornar-se grande produtor de flores e plantas ornamentais, destacando-se as espécies tropicais, devido à grande diversidade genética e ao clima propício para a sua produção. A floricultura tropical, classificada como um negócio lucrativo, vem se expandindo e sendo considerada uma alternativa viável para pequenas áreas rurais (JUNQUEIRA; PEETZ, 2011b).

Dentre as espécies tropicais, destaca-se o antúrio, que tem apresentado boa aceitação nos mercados interno e externo. Dessa forma, existem perspectivas favoráveis para elevar a sua produção, comercialização e consumo, em ambos os mercados (ANEFALOS et al., 2010).

O antúrio (*Anthurium* sp.) é uma importante flor tropical, pertencente à família Araceae, sendo originário das Américas do Sul e Central (COELHO; CATHARINO, 2005). A principal espécie desse gênero, *Anthurium andraeanum* Linden, tem como centro de origem a Venezuela e a Colômbia, sendo preferida sobre as outras flores tropicais, devido ao tamanho, cor e durabilidade pós-colheita das suas inflorescências (TOMBOLATO et al., 2004b; TOMBOLATO; CASTRO, 2005).

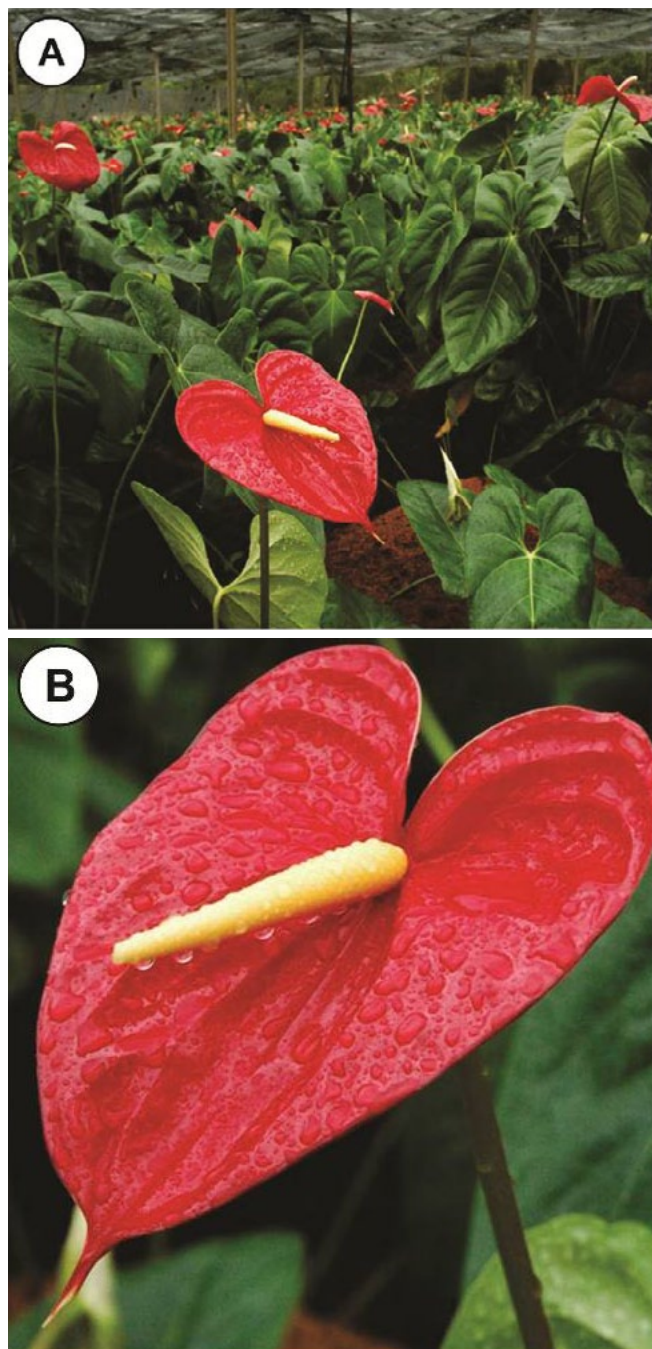
No mercado mundial, os antúrios têm grande importância econômica e, entre as flores tropicais, atingem o segundo maior valor comercial, perdendo apenas para as orquídeas (DUFOUR; GUÉRIN, 2003; CHEN et al., 2003). No Brasil, os antúrios vêm sendo largamente utilizados na floricultura e no paisagismo, e, atualmente,

é a principal espécie de flor tropical de interesse econômico (ANEFALOS et al., 2010), destacando-se tanto no mercado interno quanto no externo. Suas inflorescências atingem o maior preço unitário, quando comparado ao de outras flores tropicais, além de possuírem longa durabilidade e resistência, em média de 25 a 30 dias, podendo chegar a 40 dias (JUNQUEIRA; PEETZ, 2008). O Estado de São Paulo é considerado o maior centro de produção e comercialização, concentradas nas regiões de Holambra, Atibaia e Vale do Ribeira (Figura 1-A). Entretanto, outros estados, como Bahia, Ceará e Pernambuco, são potenciais regiões de produção (LEME; HONÓRIO, 2004; CALDARI JÚNIOR, 2004).

O programa de melhoramento genético de antúrios, conduzido pelo Instituto Agrônomo (IAC), em Campinas, SP, desde 1980, foi responsável pelo desenvolvimento das primeiras variedades brasileiras, para cultivo e plantio comercial tanto para flor de corte quanto para planta de vaso. Esse programa tem como objetivo a produção de plantas de menor custo e bem adaptadas às condições climáticas do País, visando competir com as cultivares importadas (TOMBOLATO et al., 2004a). Dentre as principais variedades de antúrio lançadas pelo IAC, destaca-se a 'Eidibel' (IAC 0-11), altamente produtiva, de crescimento rápido, vigorosa, de porte médio, com espata de formato cordiforme de tamanho médio, com textura grossa e de boa enervação, de coloração vermelha forte e espádice branca suavemente perfumada e de longa durabilidade pós-colheita (Figura 1-B). Devido à coloração de sua inflorescência, vermelha forte, cor de maior demanda no mercado de flores de corte, e à boa produtividade alcançada em diferentes condições ambientais, representa de 50% a 60% de todo o mercado brasileiro de antúrio. Esses fatores possibilitaram que essa variedade se tornasse a mais cultivada (LEME; HONÓRIO, 2004) e comercializada para flor de corte no País (TOMBOLATO et al., 2004a).

Propagação

A propagação do antúrio ocorre por via sexuada e assexuada. A produção de mudas por sementes é um processo lento, gerando progênes heterogêneas devido à polinização cruzada (BEJOY et al., 2008), em função do fenômeno da protoginia. Nesse processo, os órgãos sexuais femininos atingem primeiramente a maturidade e tornam-se receptivos,



Fotos: David dos Santos Júnior

Figura 1. (A) Plantio comercial de antúrio (*Anthurium andraeanum*) cv. Eidibel, sob cultivo protegido, na região do Vale do Ribeira, em São Paulo. (B) Inflorescência de antúrio cv. Eidibel, tipo espiga (espádice) e bráctea (espata); o conjunto normalmente é conhecido como flor.

enquanto as estruturas masculinas ainda se encontram imaturas, dificultando a autofecundação e favorecendo o cruzamento natural entre plantas (TOMBOLATO; CASTRO, 2005). Consequentemente, as plantas resultantes podem variar em vigor, tamanho e produtividade, e as inflorescências, apresentar diferenças em relação à cor, forma e tamanho. Tem sido observado também que

as plantas derivadas de sementes apresentam diversidade quanto à época para o início da floração (JAHAN et al., 2009). Além disso, as sementes não podem ser conservadas, devendo ser coletadas logo após a maturação do fruto, permanecendo viáveis por apenas 2 a 3 dias, após a coleta (VIÉGAS et al., 2007). Ademais, as sementes apresentam baixa taxa de germinação, em torno de 20% a 30% (JAHAN et al., 2009).

Por outro lado, a propagação vegetativa, obtida por meio da divisão de touceiras ou por estaquia, possibilita a disseminação de pragas e doenças, além de limitar a quantidade de mudas disponíveis (TOMBOLATO et al., 2004a). Dessa forma, a propagação in vitro tem sido bastante utilizada como importante método para a produção massiva de mudas dessa espécie, permitindo a uniformização das características (FUZITANI; NOMURA, 2004; MAIRA et al., 2009).

Atualmente, a maioria das variedades de antúrio disponíveis para comercialização como plantas de vaso, no mercado internacional, é produzida por cultura de tecidos (MAIRA et al., 2010). O uso dessa técnica tem sido sugerido como alternativa para o aumento da produção de antúrio (JAHAN et al., 2009).

Em pesquisa desenvolvida visando ampliar o conhecimento sobre flores tropicais, com ênfase na cultura do antúrio e na adoção de novas tecnologias, constatou-se que 97% dos entrevistados consideraram que o uso de mudas micropropagadas representa um bom investimento, desde que haja garantia de qualidade do produto, com produção de clones melhorados, mais homogêneos e resistentes a pragas e doenças (ANEFALOS et al., 2010).

Micropropagação (Propagação in vitro)

Vários trabalhos têm sido conduzidos com a cultura de tecidos de antúrio, visando à avaliação do seu potencial morfogênico na obtenção de mudas. De uma forma geral, o fator mais importante tem sido a especificidade da cultivar, resultando na necessidade do desenvolvimento de protocolos exclusivos para cada genótipo. Devem ser levados em conta o tipo e a idade do explante a ser utilizado (GANTAIT; MANDAL, 2010).

O antúrio tem sido propagado in vitro tradicionalmente mediante a organogênese indireta, por meio do cultivo de explantes foliares, indução de

calos e posterior formação de gemas adventícias. Entretanto, esse método proporciona taxas de multiplicação relativamente baixas e inconsistentes, com a provável ocorrência de variação somaclonal nas mudas obtidas (TE-CHATTO et al., 2006; BAUTISTA et al., 2008).

Em relação aos métodos organogênicos, Gantait et al. (2012) mencionam que a melhor resposta foi a registrada por Gantait et al. (2008), com, aproximadamente, 60 mudas obtidas a partir de uma única gema apical, num período de 103 dias. Entretanto, os autores ressaltam que outros métodos de micropropagação necessitam ser estudados visando à obtenção de maior número de mudas por explante. É o caso da utilização da embriogênese somática, uma das principais técnicas da propagação in vitro, que permite a produção massiva de plantas e a redução de mão de obra, possibilitando diminuir significativamente o custo por unidade produzida, além dos embriões somáticos poderem ser produzidos de forma sincronizada, com alto grau de uniformização e conformidade clonal (YEUNG, 1995).

Embriogênese somática

Entre os métodos de propagação in vitro, a embriogênese somática é considerada a mais adequada para a produção de mudas em larga escala, para várias espécies vegetais (MATSUMOTO et al., 1996). Essa técnica também apresenta grande aplicabilidade para estudos relacionados com a fisiologia, genética e bioquímica do desenvolvimento embrionário (YEUNG, 1995; FEHÉR et al., 2003; FEHÉR, 2005), além de constituir uma ferramenta para a obtenção de plantas transgênicas, a preservação de germoplasma por criopreservação, a hibridação somática, entre outros (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

A princípio, a formação de embriões a partir de tecidos somáticos in vitro é semelhante à embriogênese zigótica que ocorre nos órgãos reprodutivos das plantas (DODEMAN et al., 2007). As células somáticas são capazes de recapitular o desenvolvimento embriogênico sem que ocorra a fusão de gametas (COSTA et al., 2006), culminando na formação de uma planta completa a partir de uma única célula. Anatômica, são formadas estruturas bipolares, constituídas de ápices caulinar e radicular. Além disso, o ápice radicular é fechado, ou seja, não tem conexão com os tecidos do explante inicial materno (ROCHA et al., 2012).

Existem dois padrões básicos de expressão da embriogênese somática: o modelo direto, no qual os embriões somáticos originam-se dos tecidos matrizes sem a formação de estágios intermediários, e o modelo indireto, no qual os embriões somáticos se formam a partir de um tecido intermediário denominado calo, que apresenta células em diferentes estádios de diferenciação e, conseqüentemente, com distintos graus de determinação (GUERRA et al., 1998; FEHÉR et al., 2003; ROCHA et al., 2012).

Segundo George et al. (2008), a regeneração de plantas via embriogênese somática ocorre em cinco etapas:

1. Indução de culturas embriogênicas a partir do cultivo inicial dos explantes em meio de cultura suplementado com reguladores de crescimento. Nesta fase, geralmente são utilizadas auxinas sintéticas em elevadas concentrações, como o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).
2. Proliferação das culturas embriogênicas em meio líquido ou semissólido, suplementado com as mesmas concentrações dos reguladores de crescimento usados no estabelecimento das culturas embriogênicas.
3. Maturação dos embriões somáticos em meio de cultura sem a adição de reguladores de crescimento. Com isso, ocorre a inibição da proliferação das culturas embriogênicas e o estímulo à formação e ao desenvolvimento dos embriões somáticos.
4. Germinação dos embriões somáticos em meio de cultura suplementado com ácido abscísico e/ou com redução no potencial osmótico.
5. Regeneração de plantas em meio de cultura desprovido de reguladores de crescimento. Nesta fase, para algumas espécies, o acréscimo de alguns componentes suplementares ao meio de cultura, como glutamina e caseína hidrolisada, pode ser necessário para a melhor aclimatização das plantas obtidas.

Na espécie *A. andraeanum*, os primeiros trabalhos com embriogênese somática foram conduzidos por Kuehnle et al. (1992), constatando que a resposta morfogênética, nesse sistema, também é genótipo

dependente. Esses autores utilizaram explantes foliares, com a adição de 2,4-D no meio de cultura, que resultaram na formação de embriões somáticos. Bautista et al. (2008) também obtiveram sucesso na obtenção de embriões somáticos, a partir a cultura in vitro de explantes foliares, cultivados em meio de cultura adicionado dessa mesma auxina. Já Pinheiro (2010) empregou explantes de segmentos nodais, constatando que a formação dos embriões somáticos foi dependente do tipo e da concentração de auxinas. O modelo de embriogênese somática empregado nesses três trabalhos foi via indireta, isto é, por meio da formação intermediária de calos.

As metodologias utilizadas para a indução de embriogênese somática, em antúrio, envolvem diferentes cultivares (KUEHNLE et al., 1992; MATSUMOTO et al., 1996; TE-CHATO et al., 2006; RAAD et al., 2012), diversas fontes de explantes (KUEHNLE et al., 1992; TE-CHATO et al., 2006; XIN et al., 2006; RAAD et al., 2012), mudanças na composição do meio de cultura (KUEHNLE et al., 1992; MATSUMOTO et al., 1996; TE-CHATO et al., 2006; BEYRAMIZADE et al., 2008; BAUTISTA et al., 2008; RAAD et al., 2012), suplementação com diferentes tipos e concentrações de reguladores de crescimento (KUEHNLE et al., 1992; MATSUMOTO et al., 1996; BAUTISTA et al., 2007; BEYRAMIZADE et al., 2008; BAUTISTA et al., 2008; RAAD et al., 2012), de açúcares e agentes gelificantes (KUEHNLE et al., 1992) e alterações nas condições de cultivo, como fotoperíodo e irradiância (RAAD et al., 2012).

Dessa forma, este estudo fornece informações sobre a metodologia de obtenção de embriões somáticos, via embriogênese somática indireta, como uma técnica alternativa para a produção de mudas micropropagadas de antúrio cv. Eidibel.

Metodologia

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos e Genética Vegetal, da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza, Ceará, e no Laboratório de Cultura de Tecidos II do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais. As análises histoquímicas e anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da UFV.

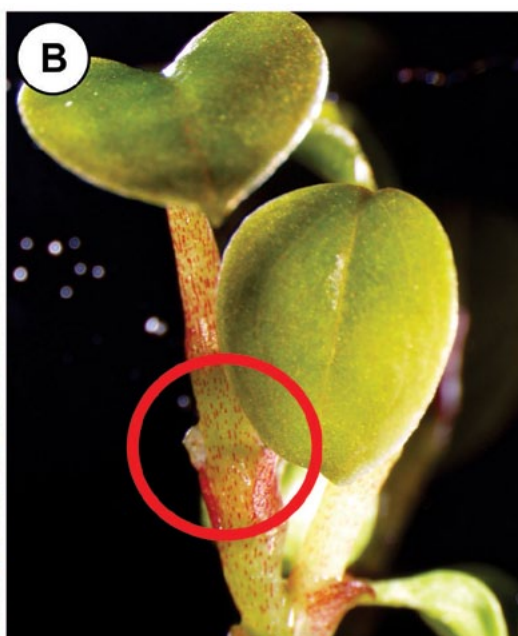
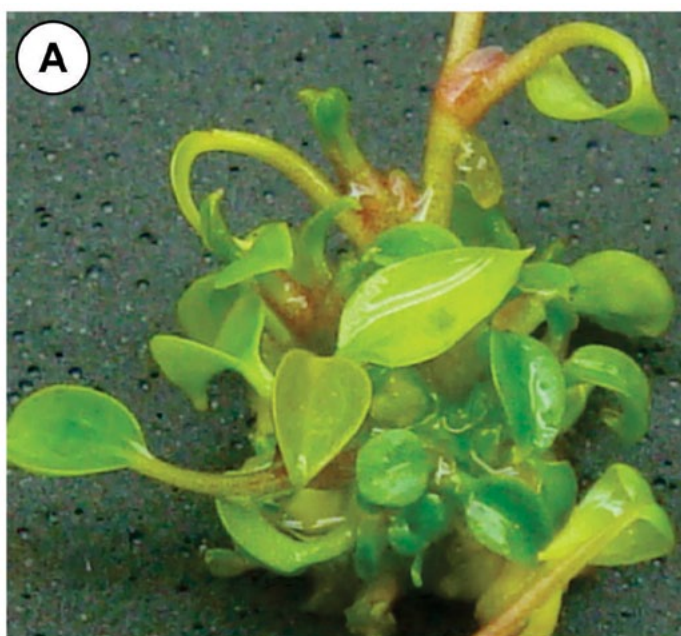
Etapa 1: Indução de calos embriogênicos

Os materiais vegetais utilizados para a indução de calos embriogênicos são explantes oriundos do seccionamento de mudas de *A. andraeanum* cv. Eidibel estabelecidas in vitro (Figura 2-A e 2-B), cedidas pelo IAC, obtidas a partir da organogênese indireta de folhas jovens (TOMBOLATO et al., 1998).

Os explantes, segmentos nodais com aproximadamente 1,0 cm de comprimento contendo uma gema (Figura 2-B), devem ser inoculados, sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, em placas de Petri de 90 mm x 15 mm, contendo

25 mL de meio de cultura ESA (PIERIK, 1976) (Tabela 1), adicionado de 10,0 μM (que corresponde a 1,86 mg L^{-1}) de ácido α -naftalenoacético (ANA) e suplementado com 20 g L^{-1} de sacarose; solidificado com 6,5 g L^{-1} de ágar (Merck®) e o pH ajustado para 5,8; e autoclavado a 121 °C, por 15 minutos. Em cada placa de Petri, devem ser inoculados, horizontalmente, nove segmentos nodais (Figura 2-C). As culturas devem ser mantidas no escuro em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 2 °C, por 60 dias. Após esse período, cerca de 50% dos explantes devem apresentar a formação de calos embriogênicos (Figura 2-D).

Foto A: Ana Cristina P. P. de Carvalho



Fotos B-D: Marcos Vinicius Marques Pinheiro

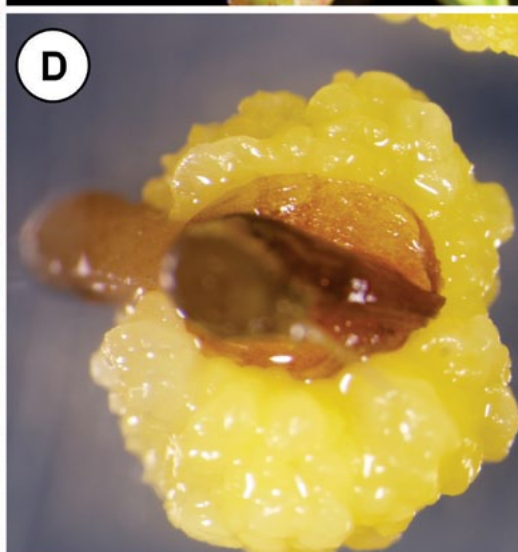


Figura 2. Indução de calos embriogênicos, a partir do cultivo in vitro de explantes de segmento nodal em antúrio (*Anthurium andraeanum*) cv. Eidibel. (A) Mudanças de antúrio cv. Eidibel, previamente estabelecidas in vitro, em desenvolvimento adequado para a excisão dos explantes para indução de calos embriogênicos. (B) Planta estabelecida in vitro, a partir da qual os explantes foram excisados. (C) Segmentos nodais inoculados horizontalmente em placa de Petri. (D) Segmento nodal com formação de calos embriogênicos, aos 60 dias após a inoculação, em meio Pierik suplementado com 10,0 μM de ANA.

Embora vários trabalhos de pesquisa tratem da produção de mudas micropropagadas de antúrio, via embriogênese somática, dados relativos à porcentagem de obtenção de calos embriogênicos, a partir dos explantes utilizados, são escassos. Te-Chato et al. (2006) verificaram que 60% e 70% dos explantes de segmento nodal formaram calos embriogênicos nos meios de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) e WPM (LLOYD; McCOWN, 1980), respectivamente. A partir de explantes foliares, foram registradas taxas de formação de calos embriogênicos que variaram de 0,0% a 38,8% (KUEHNLE et al., 1992), de 29,3% a 48,7% (BAUTISTA et al., 2008) e 61,1% (MATSUMOTO et al., 1996). Na metodologia proposta, metade dos explantes de segmento nodal é responsiva na formação de calos embriogênicos, (PINHEIRO et al., no prelo. a), indicando que esse valor é semelhante aos citados na literatura, e que as variações registradas devem ser atribuídas aos protocolos utilizados, bem como às cultivares de antúrio estudadas.

Vários estudos têm destacado o papel fundamental da aplicação de auxinas como indutores da embriogênese somática, em especial o 2,4-D. Essa auxina tem sido considerada a mais indicada para a indução de maiores taxas de embriões somáticos na espécie *A. andraeanum* (KUEHNLE et al., 1992; BAUTISTA et al., 2008). Entretanto, Guerra et al. (1998) ressaltam que a manutenção prolongada dos calos embriogênicos em meio contendo 2,4-D pode induzir variações genéticas e epigenéticas, afetando o potencial embriogênico das culturas. Além disso, os mesmos autores observaram que os embriões somáticos tornam-se habituados quando cultivados por longos períodos na presença dessa auxina, resultando na perda do potencial de maturação e, conseqüentemente, da capacidade de conversão dos embriões em plantas. Como, em antúrio, a indução

de calos é um processo de difícil obtenção e que demanda muito tempo, cerca de 2 meses (RAAD et al., 2012), a recomendação de um protocolo com a utilização de outra fonte de auxina, como o ANA, é uma alternativa viável para obtenção de embriões somáticos nessa espécie, visando evitar os efeitos negativos causados pelo 2,4-D. Além disso, não há registro na literatura sobre os efeitos de ANA em cultivos prolongados, na indução de variações genéticas e epigenéticas afetando o potencial embriogênico das culturas.

Aos 60 dias, a natureza dos calos embriogênicos (Figura 3-A) pode ser diagnosticada por aspectos histoquímicos, por meio da dupla coloração com carmim acético (2%) e azul de Evans (0,1%), seguindo-se o proposto por Durzan (1988). As estruturas que reagiram ao carmim acético são coradas de vermelho e revelam setores com características embriogênicas (Figura 3-B); aquelas que reagirem ao azul de Evans são coradas de azul, revelando estruturas não embriogênicas. Assim, confirma-se a presença de calos embriogênicos, e não de massas parenquimáticas calosas. Além disso, pode-se realizar o teste de lugol (0,1%) em calos macerados para detectar a presença de amido (JENSEN, 1962), já que os calos embriogênicos possuem elevada quantidade de amido em suas células que reagem ao lugol, corando de amarelo-escuro a preto-azulado (Figura 3-C). Isso confirma que os calos produzidos possuem células embriogênicas. Os calos embriogênicos formados devem apresentar coloração amarelo-clara, e os embriões somáticos, tanto a presença de grãos de amido em suas células, quanto de procâmbio e delimitações da protoderme bem definidas, além de sinais de polarização (Figura 3-D; 3-E), confirmados a partir do uso de técnicas da Anatomia Vegetal (KARNOVSKY, 1965; O'BRIEN; MACCULLY, 1981).

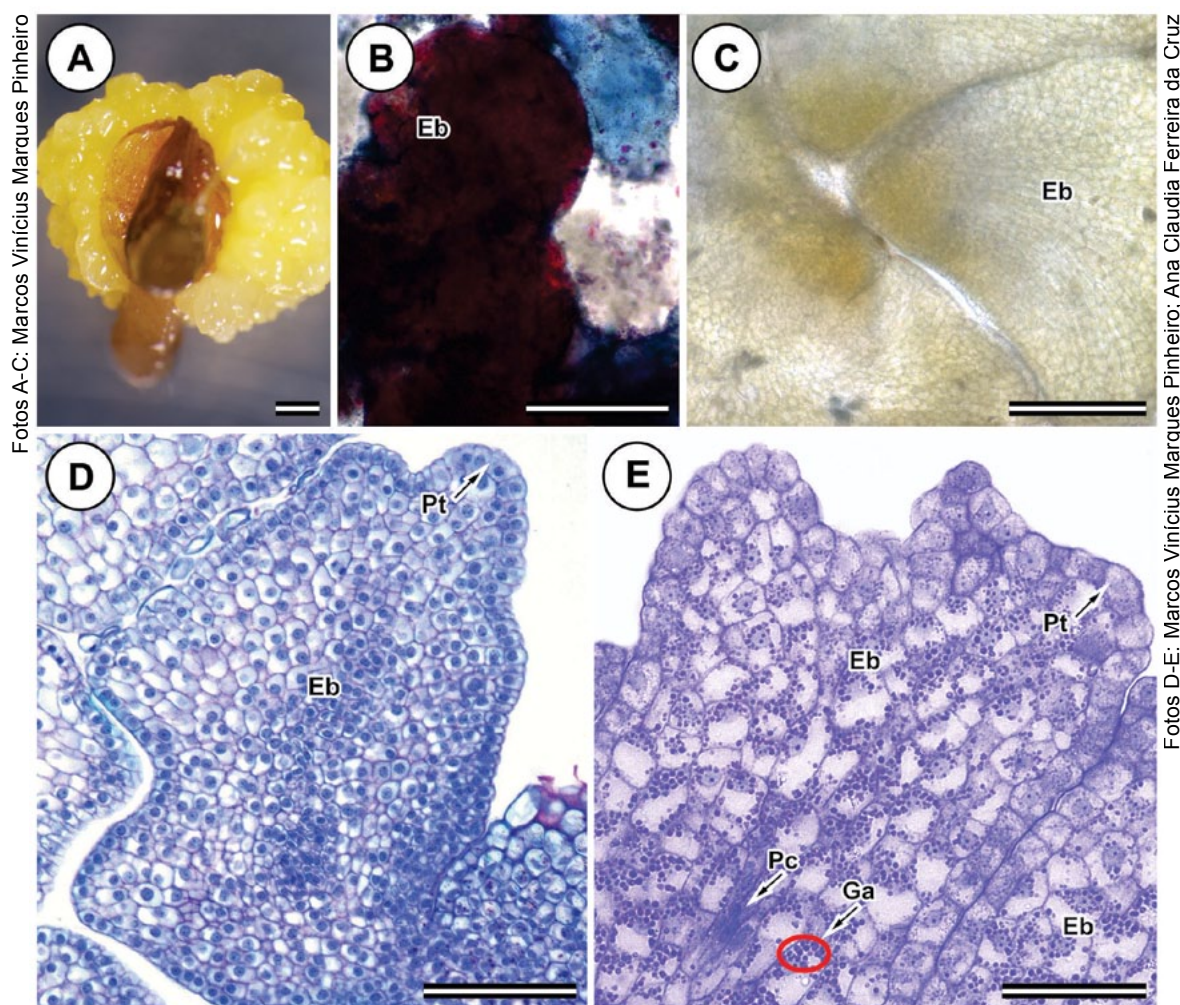


Figura 3. Indução de calos embriogênicos em explantes de segmento nodal de antúrio (*Anthurium andraeanum*) cv. Eidibel, em meio Pierik suplementado com 10,0 μM de ANA. (A) Calos embriogênicos induzidos aos 60 dias de cultivo in vitro. (B) Culturas embriogênicas, em que as células de coloração vermelha revelam características embriogênicas. (C) Culturas embriogênicas coradas com lugol para detecção de amido (reação positiva: coloração marrom). (D-E) Seções transversais de embriões somáticos desenvolvidos aos 60 dias de cultivo in vitro. (D) Embrião somático com início de formação de protoderme. (E) Embriões somáticos com formação de protoderme e procâmbio, além da presença de grãos de amido em suas células, quando corados com lugol. Eb: embrião; Pt: protoderme; Pc: procâmbio; Ga: grãos de amido; círculo: evidencia a presença de grãos de amido nas células embriogênicas. Barras: A: 500 μm ; B: 300 μm ; C: 200 μm ; D: 150 μm ; E: 100 μm .

Etapa 2: Proliferação das culturas embriogênicas

Para a proliferação das culturas embriogênicas, recomenda-se que os calos embriogênicos, obtidos na Etapa 1, sejam subdivididos, isto é, seccionados em partes menores (Figura 4-A). Cada calo pode ser dividido, em média, em duas partes, sendo, posteriormente, transferidas, sob condições assépticas, em câmara de fluxo laminar, para placas de Petri contendo meio de cultura na mesma composição e quantidade citadas para a Etapa 1. Sugere-se a inoculação de nove calos por placa de Petri. As culturas devem ser mantidas nas mesmas condições estabelecidas para a Etapa 1.

A Etapa 2 tem como objetivo a estabilização da capacidade embriogênica e da proliferação das linhagens celulares, por meio de quatro subcultivos, a cada 60 dias. Guerra et al. (1998) enfatizam que são necessários 4 ou 5 subcultivos sucessivos para que ocorram a purificação e a estabilização das culturas embriogênicas, de tal maneira que elas possam ser consideradas linhagens celulares embriogênicas. Sendo assim, com esse procedimento de subcultivos, serão produzidos embriões somáticos secundários (Figura 4-B), e a partir daí poderão ser efetuados subcultivos sucessivos até que se obtenha quantidade desejada de calos embriogênicos para a introdução da Etapa 3.

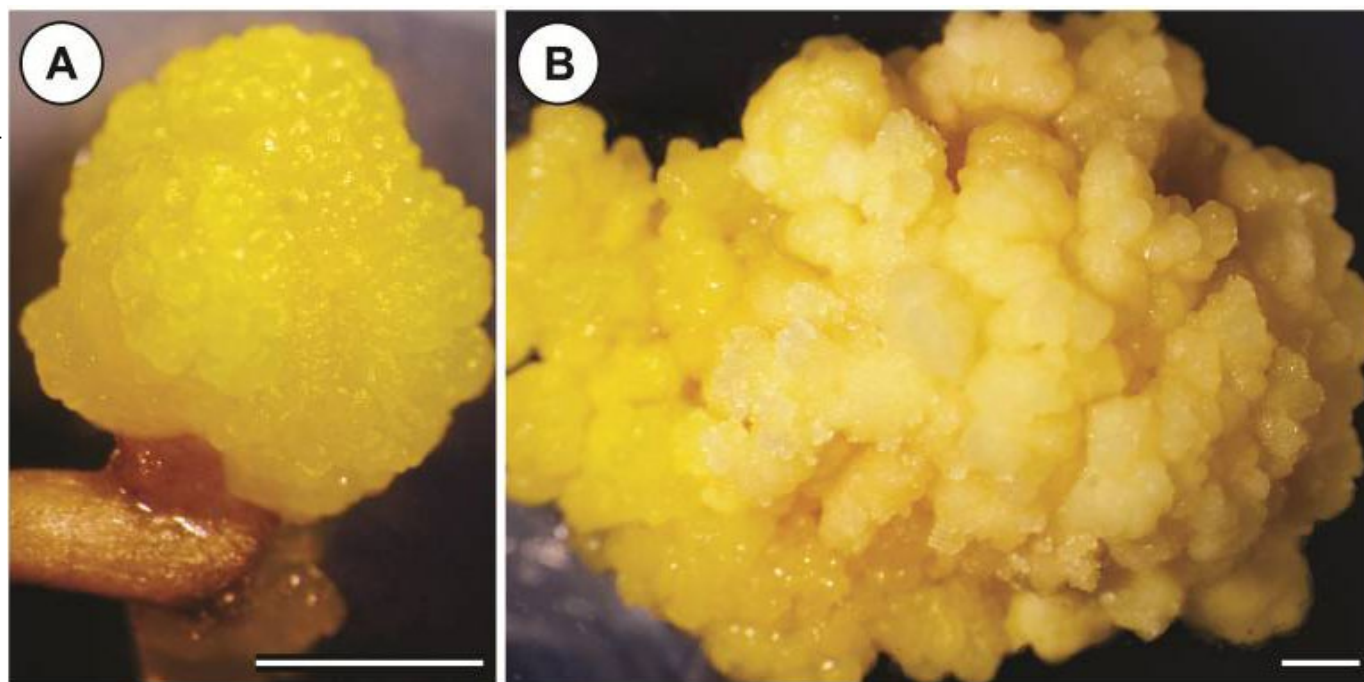


Figura 4. Proliferação de calos embriogênicos de antúrio (*Anthurium andraeanum*) cv. Eidibel. (A) Calo embriogênico, aos 60 dias, induzido em meio Pierik suplementado com 10,0 µM de ANA. (B) Calo embriogênico subcultivado a cada 60 dias, no mesmo meio indutor, evidenciando embriogênese somática secundária. Barras: A: 500 µm; B: 1.000 µm.

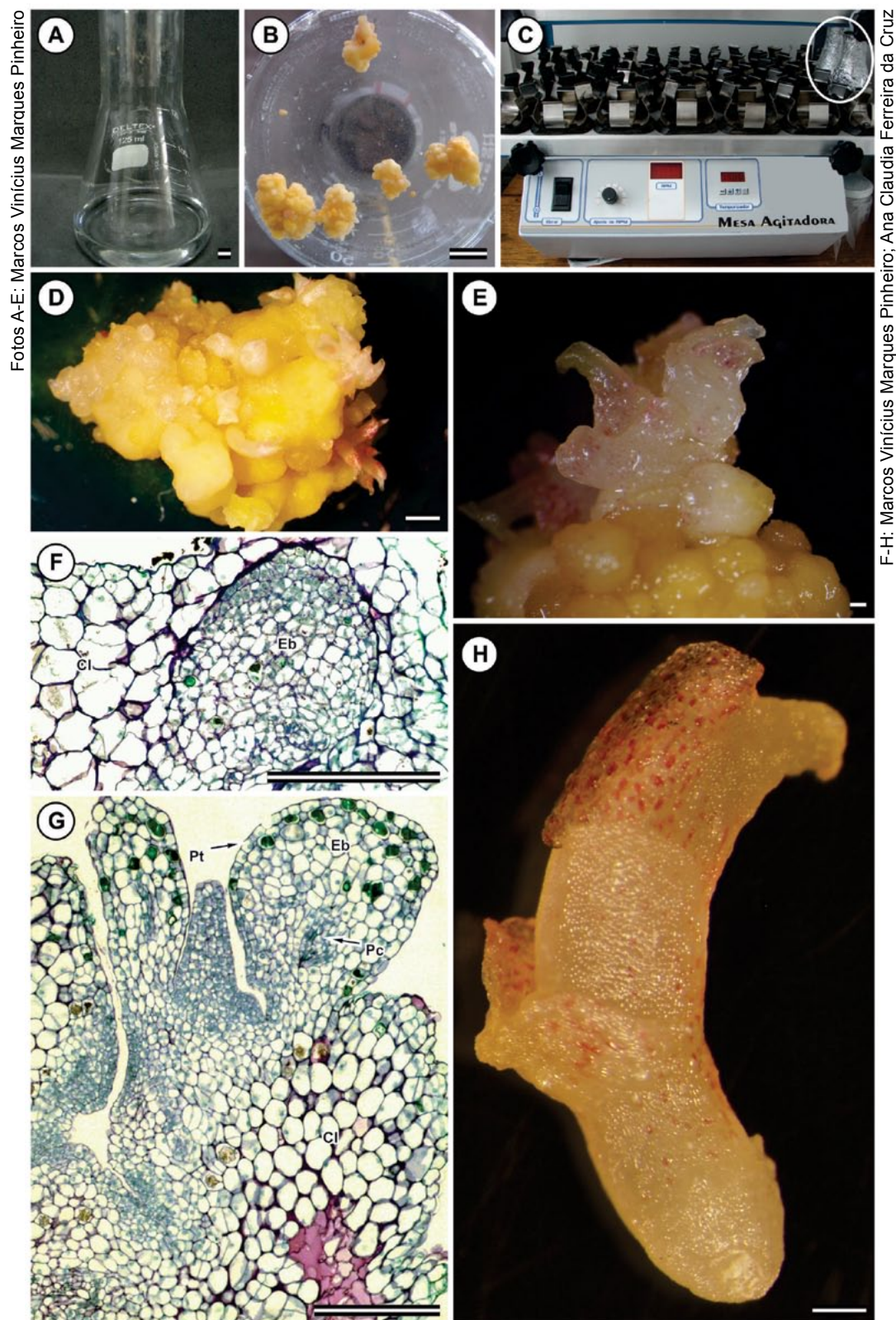
Etapas 3: Maturação dos embriões somáticos

Para a maturação dos embriões somáticos, calos embriogênicos obtidos na Etapa 2 devem ser selecionados em função da presença de setores com grande capacidade de proliferação (Figura 4-B) e crescimento embrionário com sinais de polarização (Figura 3-D e 3-E) (PINHEIRO et al., no prelo. **b**).

Nessa fase, os calos embriogênicos selecionados, com cerca de 90 mg de massa fresca (Figura 5-B), devem ser inoculados, sob condições assépticas, em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura ESB líquido suplementado com 0,47 µM (que corresponde a 0,10 mg L⁻¹) de 6-furfurilaminopurina (cinetina) (Tabela 1), como mostrado na Figura 5-A. Os calos embriogênicos devem ser mantidos em sala de crescimento a 25±2 °C, no escuro (cobertos por papel alumínio), sob agitação orbital a 100 rpm, durante 45 dias (Figura 5-C).

Ao final desse período, são produzidos cerca de 5,2 embriões somáticos por calo embriogênico. Embora apresentem desenvolvimento normal, não ocorre o desprendimento dos embriões dos calos embriogênicos (Figura 5-D). É possível observar ainda que os calos apresentam textura friável, alguns com desenvolvimento embrionário avançado, ou seja, embriões nos estádios de globular ao estágio juvenil (germinado), como mostrado na Figura 5-E.

Por meio da análise histológica das culturas embriogênicas, é possível observar embriões em diferentes estádios de maturação (Figura 5-F e 5-G); embriões somáticos em início de formação (Figura 5-F); embriões somáticos com protoderme bem definida e presença de procâmbio, evidenciando a presença de um sistema vascular fechado, o que demonstra sinais de polarização (Figura 5-G); embrião somático em estágio avançado de desenvolvimento (Figura 5-H).



Fotos A-E: Marcos Vinícius Marques Pinheiro

F-H: Marcos Vinícius Marques Pinheiro; Ana Claudia Ferreira da Cruz

Figura 5. Maturação de calos embriogênicos de antúrio (*Anthurium andraeanum*) cv. Eidibel. (A) Erlenmeyer, contendo 25 mL de meio de cultura Pierik líquido suplementado com $0,47 \mu\text{M}$ de cinetina, para a inoculação dos calos embriogênicos. (B) Explante inicial: calos embriogênicos inoculados em Erlenmeyer contendo o referido meio. (C) Manutenção dos calos embriogênicos em mesa agitadora, no escuro, sob agitação orbital a 100 rpm, durante 45 dias. (D) Explante final: calos embriogênicos com embriões somáticos em diferentes estádios de desenvolvimento, aos 45 dias de cultivo. (E) Explante final: calos embriogênicos com embriões de maturação completa e germinados, aos 45 dias de cultivo. (F) Calos embriogênicos com início de formação de embrião somático. (G) Embrião somático em estágio intermediário de desenvolvimento, com protoderme e procâmbio bem definidos. (H) Maturação completa do embrião em planta, demonstrando zonas meristemáticas apical e radicular evidentes, Cl: calo; Eb: embrião; Pc: procâmbio; Pt: protoderme. Barras: A: 5 mm; B: 10 mm; C: 30 mm; D: 1 mm; E: 100 μm ; F; G; H: 300 μm .

Etapa 4: Germinação dos embriões somáticos

Nessa fase, cerca de quatro calos embriogênicos com embriões maduros devem ser inoculados, sob condições assépticas em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultura ESC, Pierik semissólido suplementado com 2,32 μM (que corresponde a 0,5 mg L⁻¹) de cinetina (Tabela 1). As culturas são mantidas em sala de crescimento a 25±2 °C, sob fotoperíodo de 16 horas e irradiância de 36 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, por 45 dias.

Aos 45 dias de cultivo in vitro, observa-se o desenvolvimento normal dos embriões somáticos em brotos com posterior regeneração de plantas (41,2%), com a presença da parte aérea e da radicular (Figura 6-A; 6-B).

Em antúrio, a porcentagem de conversão de embriões somáticos em plantas é muito inconstante, principalmente em função do genótipo e da composição do meio de cultura, usado na etapa inicial de indução dos calos embriogênicos.

Tabela 1. Meios de cultura ESA (etapas 1: indução de calos embriogênicos e 2: proliferação das culturas embriogênicas), ESB (etapa 3: maturação dos embriões somáticos) e ESC (etapa 4: germinação dos embriões somáticos) utilizados na produção de mudas micropropagadas de antúrio, (*Anthurium andraeanum*) via embriogênese somática (PIERIK, 1976 modificado).

Meio de cultura componente ⁽¹⁾	ESA	ESB	ESC
	mg L ⁻¹		
Nitrato de amônio (NH ₄ NO ₃)	825	825	825
Nitrato de potássio (KNO ₃)	950	950	950
Sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	185	185	185
Fosfato monobásico de potássio (KH ₂ PO ₄)	85	85	85
Cloreto de cálcio tetra-hidratado (CaCl ₂ ·4H ₂ O)	220	220	220
Sacarose	20.000	20.000	20.000
ANA	1,86	-	-
Cinetina	-	0,10	0,50
Ágar (Merck®)	6.500	-	6.500

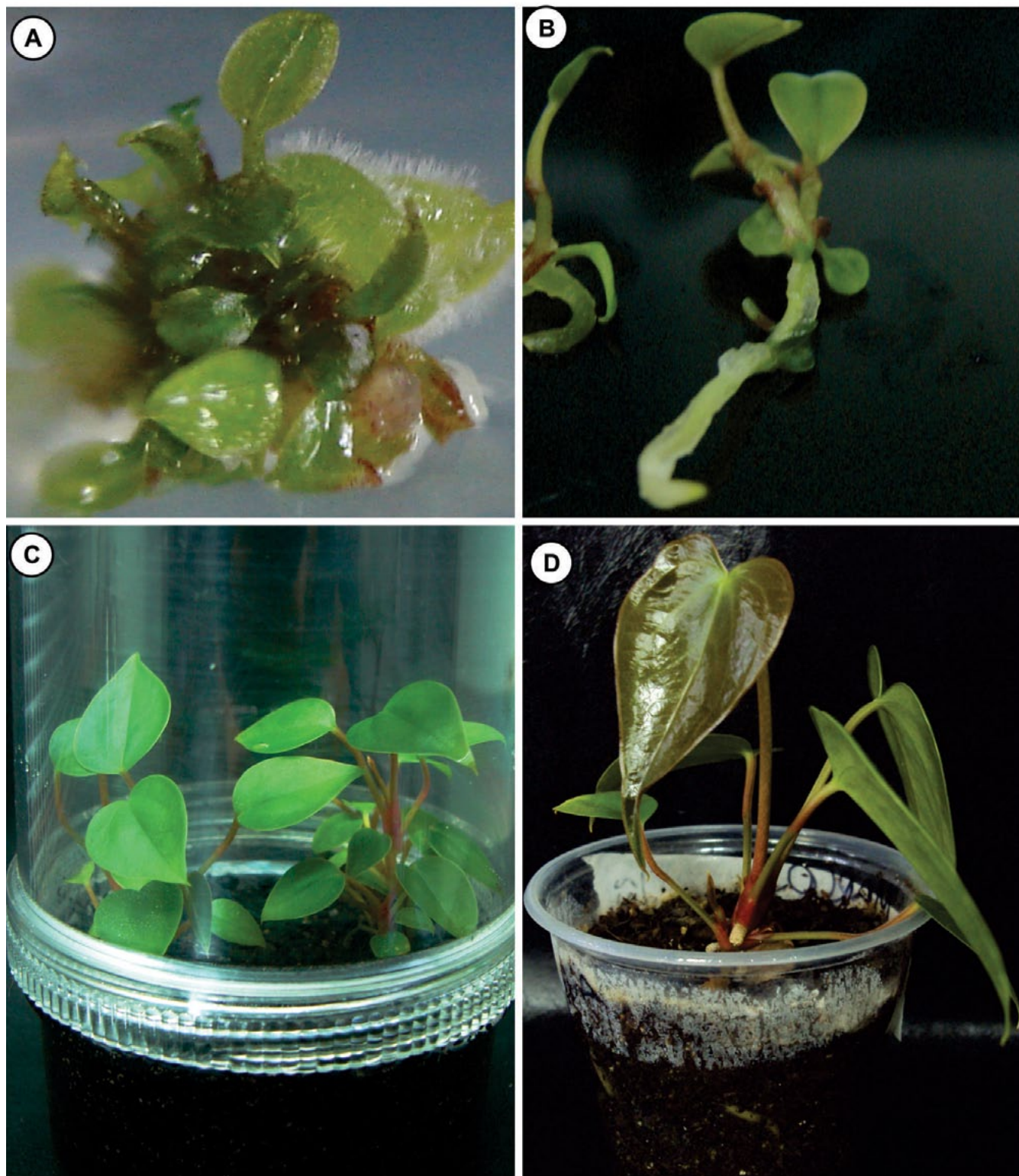
⁽¹⁾ Este meio deve ser adicionado de microelementos, FeEDTA, mio-inositol e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962).

Kuehnle et al. (1992) constataram porcentagens de formação de plantas que variaram de 14% a 85%, 70% e 100% para os híbridos UH780, UH965 e UH1060, respectivamente. Na cultivar Lambada, em função da concentração da citocinina adicionada ao meio de cultura, a porcentagem de embriões somáticos que formaram plantas variou de 29,8% a 64,5% (BAUTISTA et al., 2008). Na metodologia proposta, 41,2% dos embriões somáticos resultaram na obtenção de plantas completas, indicando que esse valor deve ser atribuído à cultivar estudada, bem como ao protocolo empregado.

Etapa 5: Aclimatização das plantas

As plantas regeneradas, provenientes dos embriões somáticos formados na Etapa 4, devem ser retiradas dos Erlenmeyers e lavadas com água corrente para a remoção do meio de cultura nelas aderido.

Após esse processo, as mudas enraizadas, com cerca de duas folhas e 1,5 cm de altura, devem ser separadas (Figura 6-B) e transplantadas, em número de cinco mudas por frasco do tipo Agripot® (Figura 6-C), contendo substrato comercial Plantmax®, e fechados com tampas plásticas transparentes de polipropileno com 6,0 cm de diâmetro e área de 90 cm², objetivando-se manter o ambiente interno do recipiente bem úmido. As plantas devem permanecer nessas condições por 2 meses, sob condições de temperatura ambiente (cerca de 28±2 °C), luminosidade artificial de 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e luz natural indireta. Após esse período, as mudas devem ser transplantadas individualmente para copos plásticos, com capacidade de 300 cm³, totalmente preenchido com o substrato Plantmax® e mantidas em casa de vegetação, com temperatura e umidade controladas (Figura 6-D). A porcentagem de sobrevivência das plantas durante a aclimatização foi de 65%.



Fotos: Marcos Vinícius Marques Pinheiro

Figura 6. Germinação dos embriões somáticos e aclimatização de mudas de antúrio (*Anthurium andraeanum*) cv. Eidibel a partir da embriogênese somática. (A) Embriões formados em meio semissólido Pierik, acrescido de $2,32 \mu\text{M}$ de cinetina. (B) Planta completa obtida a partir da conversão dos embriões somáticos. (C) Detalhe do tipo de frasco (Agripot®) utilizado para a aclimatização das mudas. (D) Planta com 5 meses de idade em casa de vegetação.

Todos os meios de cultura são acrescidos dos microelementos, FeEDTA, mio-inositol e vitaminas do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), tendo o pH corrigido para 5,8 e autoclavados a 121°C , durante

15 minutos. Em relação aos meios ESA e ESC, que possuem a consistência semissólida, a quantidade do agente gelificante a ser adicionada ao meio de cultura vai depender da marca do produto.

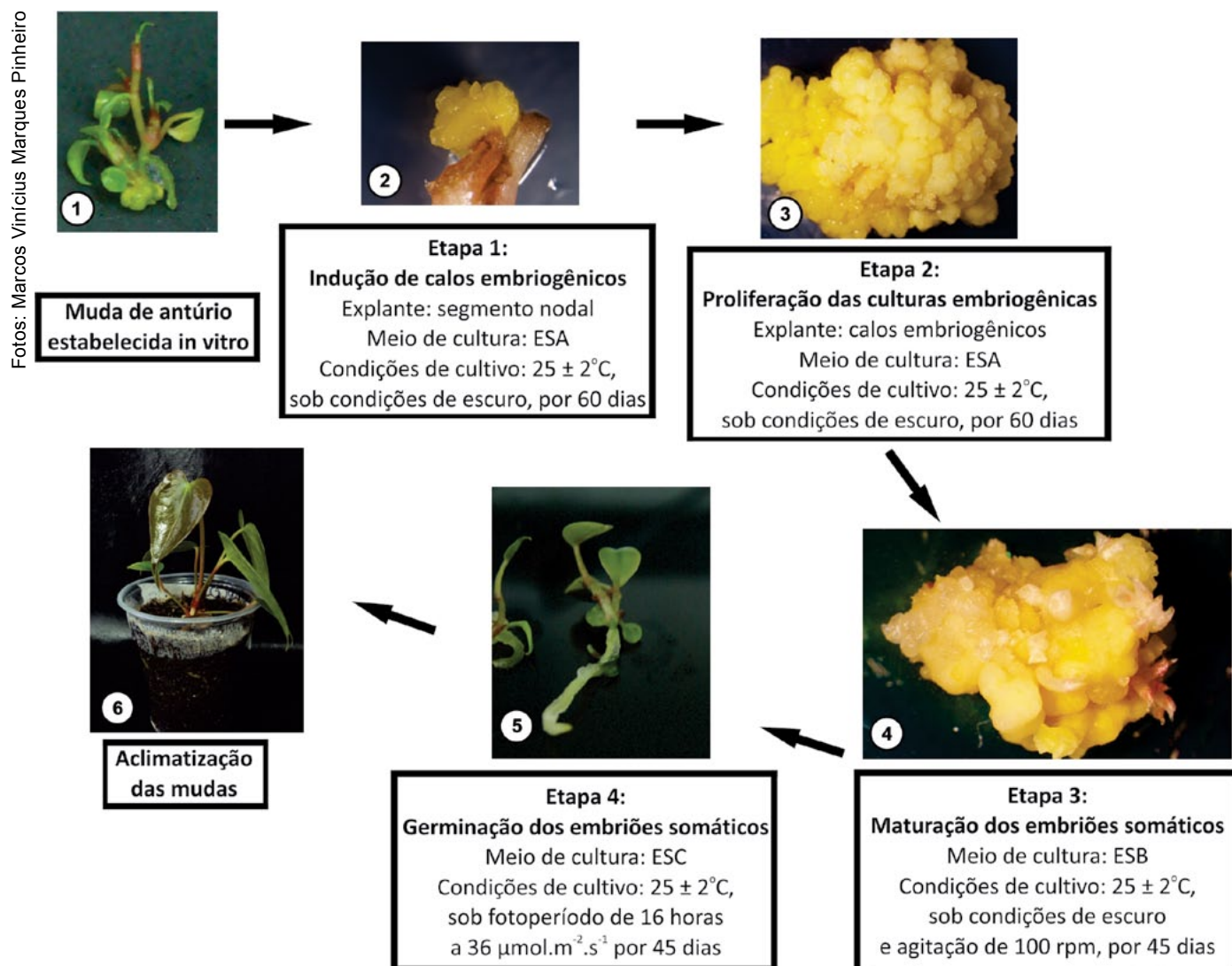


Figura 7. Esquema ilustrativo resumido das fases da embriogênese somática em antúrio (*Anthurium andraeanum*) cv. Eidibel.

Considerações

O protocolo em questão (Figura 7) abre novas possibilidades para a transformação genética de plantas, preservação de germoplasma por criopreservação e integração de técnicas associadas à tecnologia de sementes sintéticas, além da rápida propagação de mudas de antúrio cv. Eidibel. Esse protocolo de embriogênese somática foi desenvolvido pela Embrapa Agroindústria Tropical, em parceria com a Universidade Federal de Viçosa, para essa cultivar. Além disso, este estudo fornece valiosas informações que podem ser utilizadas no futuro para aprimorar a técnica de propagação in vitro dessa espécie cultivada no Brasil, favorecendo a produção de mudas para produtores de antúrio em todas as regiões do País.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Instituto Agrônomo (IAC) por cederem as mudas in vitro para a realização deste trabalho; à Embrapa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo auxílio à pesquisa; e à Capes, pela concessão de bolsa ao segundo autor.

Referências

- ANEFALOS, L. C.; TOMBOLATO, A. F. C.; RICORDI, A. Panorama atual e perspectivas futuras da cadeia produtiva de flores tropicais: o caso do antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 16, n. 1, p. 107-111, 2010.
- BAUTISTA, N. R. del; PEÑALVER, D. A.; RODRÍGUEZ, R. B.; CHIU, W. C.; LÓPEZ, R. C.; TERRY, F. J.; PERALTA, M.

- P.; MARTÍNEZ, O. G. Embriogénesis somática en (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad 'Lambada'. **Ra Ximhai**, México, v. 4, n. 1, p. 135-149, 2008.
- BEJOY, M.; SUMITHA, V. R.; ANISH, N. P. Foliar regeneration in *Anthurium andraeanum* Hort. cv. Agnihothri. **Biotechnology**, Pakistan, v. 7, n.1, p. 134-138, 2008.
- BEYRAMIZADE, E.; AZADI, P.; MII, M. Optimization of factors affecting organogenesis and somatic embryogenesis of *Anthurium andraeanum* Lind 'Tera'. **Propagation of Ornamental Plants**, v. 8, n. 4, p. 198-203, 2008.
- CALDARI JÚNIOR, P. Técnicas de cultivo de antúrio (*Anthurium andraeanum*). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 43-45, 2004.
- CHEN, J.; MCCONNELL, D. B.; HENNY, R. J.; EVERITT, K. C. Cultural guidelines for commercial production of interior space *Anthurium*. 2003. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/EP/EP15900.pdf>>. Acesso em: 17 ago. 2012.
- COELHO, M. A. N.; CATHARINO, E. L. M. Duas espécies novas de *Anthurium* Schott (Araceae) para o Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 88, p. 35-41, 2005.
- COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, A. S.; ALMEIDA, W. A. B.; Morfogênese *in vitro*. In: SOUZA, A. S. da; JUNGHANS, T. G. (Ed.). **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz das Almas : Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006. p. 115-130.
- DODEMAN, V.L.; DUCREUX, G.; KREIS, M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 8, p. 1493-1509, 2007.
- DUFOR, L.; GUÉRIN, V. Growth, developmental features and flower production of *Anthurium andraeanum* Lind. in tropical conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 25-35, 2003.
- DURZAN, D. J. Process control in somatic polyembryogenesis. In: HALLGREN, J. E. (Ed.). **Frans Symposium Department of Forest Genetics and Plant Physiology**. Swedish: University of Agricultural Sciences, 1988. v. 8, p. 147-186.
- FEHÉR, A. Why somatic plant cells start to form embryos? In: MUJIB, A., SAMAJ, J. (Ed.) **Somatic embryogenesis**. Berlin: Springer, 2005. p 85-101.
- FEHÉR, A.; PASTERNAK, T. A.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 74, n. 3, p. 201-228, 2003.
- FUZITANI, E. J.; NOMURA, E. S. Produção de mudas *in vitro*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 14-17, 2004.
- GANTAIT, S.; MANDAL, N. Tissue culture of *Anthurium andraeanum*: a significant review and future prospective. **International Journal of Botany**, Pakistan, v. 6, n. 3, p. 207-219, 2010.
- GANTAIT, S.; MANDAL, N.; BHATTACHARYYA, S.; DAS, P. K. In vitro mass multiplication with pure genetic identity in *Anthurium andraeanum* Lind. **Plant Tissue Culture & Biotechnology**, Rehovot, v. 18, n. 2, p. 113-122, 2008.
- GANTAIT, S.; SINIAH, U. R.; MANDAL, N.; DAS, P. K. Direct induction of protocorm-like bodies from shoot tips, plantlet formation, and clonal fidelity analysis in *Anthurium andraeanum* cv. CanCan. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 67, n.3, p. 257-270, 2012.
- GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. D. **Plant propagation by tissue culture**. Dordrecht: Springer, 2008. 501 p.
- GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa: CBAB. 1998, v. 2, p. 533-568.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry: principles and practice**. San Francisco: WH Freeman, 1962. 408 p.
- JAHAN, M. T.; ISLAM, M. R.; KHAN, R.; MAMUN, A. N. K. AHMED, G.; HAKIM, L. *In vitro* clonal propagation of anthurium (*Anthurium andraeanum* L.) using callus culture. **Plant Tissue Culture & Biotechnology**, Rehovet, v. 19, n. 1, p. 61-69, 2009.
- JUNQUEIRA, H. A.; PEETZ, M. S. Mercado interno para os produtos da floricultura brasileira: características, tendências e importância sócio-econômica recente. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 37-52, 2008.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da. 2010: Balanço do comércio exterior da floricultura brasileira. **Hortica News**. Contexto & Perspectiva, Boletim de Análise Conjuntural, mar. 2011b. Disponível em: <http://www.hortica.com.br/artigos/2010_Balanco_do_Comercio_Exterior_da_Floricultura_Brasileira.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2012.
- JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. da. 2011 (janeiro a maio): balanço do comércio exterior da floricultura brasileira. **Hortica News**. Contexto & Perspectiva, Boletim de Análise Conjuntural, jun. 2011a. Disponível em: <http://www.hortica.com.br/artigos/2011_janeiro_a_maio_Balanco_do_Comercio_Exterior_da_Floricultura_Brasileira.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2012.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.
- KUEHNLE, A. R.; CHEN, F. C.; SUGII, N. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Anthurium andraeanum* hybrids. **Plant Cell Reports**, New York, v. 11, n. 9, p. 438-442, 1992.
- LEME, J. M.; HONÓRIO, S. L. Padronização e qualidade de antúrio. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 10, n. 1/2, p. 48-50, 2004.
- LLOYD, G.; Mc COWN, B. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendro* spp. **HortScience**, Alexandria, v.15, n. 3, p. 416, 1980. Abstracts 321.
- MAIRA, O.; ALEXANDER, M.; VARGAS, T. R. Micropropagation and organogenesis of *Anthurium andraeanum* cv. Rubrun. **Methods in Molecular Biology**, Totowa, v. 589, p. 3-14, 2009.
- MAIRA, O.; ALEXANDER, M.; VARGAS, T. E. Micropropagation and organogenesis of *Anthurium andraeanum* Lind cv. Rubrun. In: JAIN, S. M.; OCHATT, S. J. (Ed.). **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants**. New York: Human Press, 2010. p. 3-14. (Methods in Molecular Biology, v. 589).

MATSUMOTO, T. K.; WEBB, D. T.; KUEHNLE, A. R. Histology and origin of somatic embryos derived from *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre Lamina. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, n. 3, p. 404-407, 1996.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 15, n.3, p. 473-497, 1962.

O'BRIEN, T.P., MCCULLY, M. E. **The study of plant structure: principles and select methods**. Melbourne: Termarcaphi Pty, 1981. 352 p.

PIERIK, R. L. M. *Anthurium andraeanum* Lindl. plantlets produced from callus tissues cultivated in vitro. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 80-82, 1976.

PINHEIRO, M. V. M. **Propagação in vitro de antúrio (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) via embriogênese somática**. 2010. 67 f. Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; CRUZ, A. C. F.; CARVALHO, A. C. P. P.; OLIVEIRA, E. J.; OTONI, W. C. Somatic embryogenesis in anthurium (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) as affected by different explants. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 36, p. 87-98, no prelo. a.

PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; CRUZ, A. C. F.; CARVALHO, A. C. P. P.; VENTRELLA, M. C.; OTONI, W. C. Maturation of *Anthurium andraeanum* cv. Eidibel somatic embryos from explants of nodal segments. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 49, p. 304-312, no prelo. b.

RAAD, M. K.; ZANJANI, S. B.; SAYYAD, A. R.; MAGHSUDI, M.; KAVIANI, B. Effect of cultivar, type and age of explant, light conditions and plant growth regulators on callus formation of *Anthurium*. **American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science**, v. 12, n. 6, p. 706-712, 2012.

ROCHA, D.; I.; VIEIRA, L. M.; TANAKA, F. A.; SILVA, L. C.; OTONI, W.C. Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: histocytological and histochemical evidences. **Protoplasma**, Wien, v. 249, p. 747-758, 2012.

SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, A. da S.; MORAIS, L. S.; SOARES, T. L.; SOUZA, F. V. D.; KOBAYASHI, A. K.; FERREIRA, C. F. SILVA, S. de O. e. Biotecnologia: algo mais que plantas transgênicas. In: REUNIÃO INTERNACIONAL DA ASSOCIAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO NAS PESQUISAS SOBRE BANANA NO

CARIBE E NA AMÉRICA TROPICAL, 17., 2006, Joinville. **Anais ...** Joinville: ACORBAT/ACAFRUTA, 2006 p. 10-23. 1 CD-ROM.

TE-CHATO, S.; SUSANON, T.; SONTIKUN, Y. Cultivar, explant type and culture medium influencing embryogenesis and organogenesis in *Anthurium* spp. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Songkla, v. 28, n. 4, p. 717-722, 2006.

TOMBOLATO, A. F. C.; CASTRO, A. C. R. de. Araceae. In: TERAPO, D.; CARVALHO, A. C. P. P. de; BARROSO, T. C. da S. F. (Ed.). **Flores tropicais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2005. il. p. 42-57.

TOMBOLATO, A. F. C.; FURLANI, P. R.; CASTRO, C. E. F.; MATHES, L. A. F.; TAGLIACOZZO, G. M. D.; SAES, L. A.; RIVAS, E. B.; COUTINHO, L. N.; BERGMANN, E. C.; LEME, J. M. Antúrio: *Anthurium andraeanum* Lindl. In: TOMBOLATO, A. F. C.; FURLANI, P. R.; CASTRO, C. E. F. de; MATHES, L. A. F.; TAGLIACOZZO, G. M. D.; SAES, L. A.; RIVAS, E. B.; COUTINHO, L. C.; BERGMAN, E. C.; IMENES, D. de LAMONICA; COSTA, A. M.; LEME, J. M. C. (Ed.). **Cultivo comercial de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 2004a. p. 61-94.

TOMBOLATO, A. F. C.; QUIRINO, E. A.; COSTA, A. M. M. Antúrio (*Anthurium andraeanum* Lindl.). In: TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. (Coord.). **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas, 1998. p. 18-21. (IAC. Boletim técnico, 174).

TOMBOLATO, A. F. C.; MATHES, L. A. F.; UZZO, R. P.; CASTRO, A. C.; SAKAI, M.; SAES, L. A. Recursos genéticos e melhoramento do antúrio (*Anthurium andraeanum* Linden) no IAC-APTA. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas, v. 10, n.1/2, p. 1-5, 2004b.

VIÉGAS, J., ROCHA, M. T. R., FERREIRA-MOURA, I., ROSA, D. L., SOUZA, J. A., CORRÊA, M. G. S.; SILVA, J. T. *Anthurium andraeanum* (Linden ex André) culture: in vitro and ex vitro. **Floriculture and Ornamental Biotechnology**, Kagawa, v. 1, n. 1, p. 61-65, 2007.

XIN, W.; XU, B.; WANG, G. D.; GUO, W. M.; WEN, F. D.; JIN, J. P. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Anthurium andraeanum*. **Acta Horticulturae Sinica**, Beijing, v. 33, n. 6, p. 12821-1286, 2006.

YEUNG, E. C. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: THORPE, T. A. (Ed.). **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 205-247.

Circular Técnica, 41

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria Tropical
Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici
Fone: (0xx85) 3391-7100
Fax: (0xx85) 3391-7109 / 3391-7195
E-mail: negocios@cnpat.embrapa.br

1ª edição (2012): on-line

Comitê de Publicações

Presidente: Marlon Vagner Valentim Martins
Secretário-Executivo: Marcos Antonio Nakayama

Membros: José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cássia Costa Cid, Rubens Sonsol Gondim e Fábio Rodrigues de Miranda.

Expediente

Revisão de texto: Marcos Antonio Nakayama
Editoração eletrônica: Arilo Nobre de Oliveira
Normalização bibliográfica: Edineide Maria M. Maia.